

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 7 月 22 日 (22.07.2004)

PCT

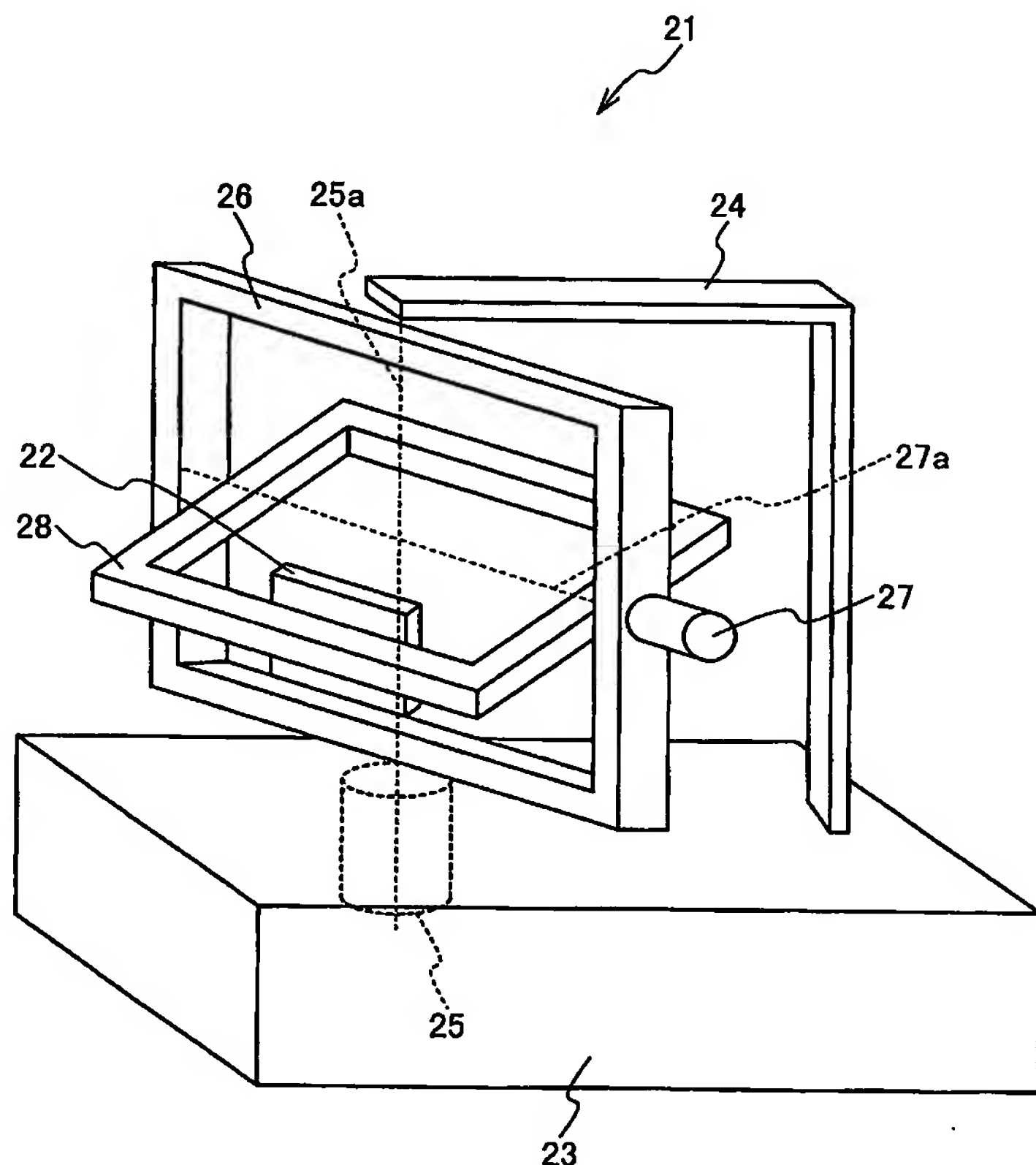
(10) 国際公開番号
WO 2004/061092 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 5/08, C12M 3/00 (71) 出願人 および
(21) 国際出願番号: PCT/JP2002/013774 (72) 発明者: 弓削 類 (YUGE, Rul) [JP/JP]; 〒731-5136 広島
県 広島市佐伯区 楽々園 6 丁目 12-23 303 号 Hiroshima
(JP). 植村 勝 (UEMURA, Masaru) [JP/JP]; 〒652-0854
兵庫県 神戸市兵庫区 和田崎町一丁目 1 番 1 号 三菱重
工業株式会社神戸造船所内 Hyogo (JP).
(22) 国際出願日: 2002 年 12 月 27 日 (27.12.2002)
(25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 工藤 実, 外 (KUDOH, Minoru et al.); 〒140-
0013 東京都 品川区 南大井 6 丁目 24 番 10 号 カドヤビル
6 F 工藤国際特許事務所内 Tokyo (JP).
(26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CA, CN, KR, US.
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (DE, FR, GB, IT, SE).
菱重工業株式会社 (MITSUBISHI HEAVY INDUS- 添付公開書類:
TRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒100-8315 東京都 千代田区 丸 ー 国際調査報告書
の内二丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF CULTURING PLURIPOTENT STEM CELLS AND CULTURE APPARATUS THEREFOR

(54) 発明の名称: 多能性幹細胞の培養方法とそのための培養装置



(57) Abstract: In a method of culturing pluripotent stem cells, the pluripotent stem cells enclosed in a first culture container are cultured under regulating the differentiation of the cells. Next, a force is applied to the cultured pluripotent stem cells enclosed in a second culture container so that the pluripotent stem cells are cultured while promoting the induction of the differentiation of the cells.

(57) 要約: 多能性幹細胞の培養方法では、第 1 培養容器に封入された多能性幹細胞の分化を抑制しながら前記多能性幹細胞が培養される。その後、第 2 培養容器に封入された前記培養された多能性幹細胞に力を印加して前記多能性幹細胞の分化誘導を促進しながら前記培養された多能性幹細胞が培養される。



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

多能性幹細胞の培養方法とそのための培養装置

技術分野

本発明は、未分化多能性幹細胞の培養方法及び培養装置に関する。本発明は、特に、分化を制御しながら未分化多能性幹細胞を培養する培養方法及び培養装置に関する。

背景技術

現在、再生医学においては、幹細胞移植により目的とする組織及び臓器を修復し、再生する技術の検討が進められている。多能性幹細胞は、増殖し、継代を繰り返す自己複製能力と共に、多種の成熟細胞に分化する分化能を有している。生体から取り出された多能性幹細胞を培養し、更に分化誘導をかけた上で、再度、生体内に戻すことにより、組織及び臓器を修復し、再生することができると考えられている。

しかし、現在では、移植された幹細胞の生着率は低い。移植された幹細胞は、生体内に存在することは可能であるが、幹細胞本来の機能を発揮するまでには至っていない。更に、幹細胞は、環境因子によって分化する方向が容易に変化するため、移植された幹細胞が目的の組織及び臓器に分化しない可能性も否定できない。

幹細胞移植技術を確立するためには、多能性幹細胞を培養する技術の確立が必要である。まず、多能性幹細胞を未

分化で培養する技術の確立が必要である。加えて、適切な分化過程にある多能性幹細胞を移植して生着率を高めると共に、事前に適切な分化誘導を多能性幹細胞に対して行う技術の確立が必要である。

従来、幹細胞の増殖技術、及び分化誘導技術としては、増殖因子及び分化因子となる薬物を含む培地で幹細胞を培養する技術が知られている。また、他の細胞と混合して幹細胞を培養する技術が知られているが、両者とも実用段階まで技術的には確立していない。更に、容器を多方向から重力を受けるように回転しながら動植物を育成する動植物育成装置が、特許公報（特公平 7－8 9 7 9 8）に開示されている。

発明の開示

本発明の目的は、多能性幹細胞の増殖及び分化を適切に制御できる多能性幹細胞の培養方法及び培養装置を提供することにある。

本発明の観点では、多能性幹細胞の培養方法は、（a）第 1 培養容器に封入された多能性幹細胞の分化を抑制しながら前記多能性幹細胞を培養するステップと、（b）第 2 培養容器に封入された前記培養された多能性幹細胞に力を印加して前記多能性幹細胞の分化誘導を促進しながら前記多能性幹細胞を培養するステップとにより達成される。

前記（a）培養するステップは、重力の方向を 3 次元的に分散して前記分化を抑制するステップを具備してもよい。前記（a）培養するステップは、前記多能性幹細胞を

n 軸回転（n は 2 以上の整数）させて重力の方向を 3 次元的に分散するステップを備えていてもよい。前記 n は 2 であり、好ましくは、1 軸は重力の方向であり、他の軸は重力の方向に直交している。

また、前記（b）培養するステップは、前記力の方向は、重力の方向とは異なることが好ましい。また、前記力は、重力の大きさより大きいことが好ましい。前記力は、重力と遠心力との合力であってもよい。

また、前記第 2 培養容器には分化誘導剤が培地に混入されていてもよい。

前記（a）培養するステップと前記（b）培養されるステップは、同一装置で行われることが好ましく、前記第 1 培養容器と前記第 2 培養容器は同一であることが好ましい。

本発明の他の観点で、培養装置は、多能性幹細胞を収容する培養容器が取り付けられる内側フレームと、前記内側フレームを回転可能に支持する外側フレームと、前記内側フレームを第 1 回転軸の周りに回転させる第 1 モータと、前記外側フレームを回転可能に支持する支持部と、前記外側フレームを第 2 回転軸の周りに回転させる第 2 モータとを具備する。

前記第 2 回転軸は重力の方向であり、前記第 1 回転軸は前記第 2 回転軸と直交する方向であることが好ましい。

前記第 2 モータは、前記第 1 モータから独立に回転可能であり、前記内側フレームは所定の回転位置で固定可能であることが好ましい。

前記培養容器は、前記第 1 回転軸と前記第 2 回転軸との交点の近くで前記内側フレームに取り付けられてもよい。また、前記多能性幹細胞の分化を抑制しながら前記多能性幹細胞を培養するときは、前記培養容器は、前記第 1 回転軸と前記第 2 回転軸との交点の近くで前記内側フレームに取り付けられ、前記多能性幹細胞の分化を誘導するときは、前記培養容器は、前記内側フレームの端部に取り付けられてもよい。

前記培養容器は、多能前記内側フレームの端部に取り付けられてもよい。

本発明の他の観点で、多能性幹細胞の培養システムは、第 1 培養容器に封入された多能性幹細胞の分化を抑制しながら前記多能性幹細胞を培養するための第 1 手段と、第 2 培養容器に封入された前記培養された多能性幹細胞に力を印加して前記多能性幹細胞の分化誘導を促進しながら前記多能性幹細胞を培養する第 2 手段とを具備する。

前記第 1 手段は、重力の方向を 3 次元的に分散して前記分化を抑制し、詳細には、前記多能性幹細胞を n 軸回転（ n は 2 以上の整数）させて重力の方向を 3 次元的に分散する。

また、前記 n は 2 であり、1 軸は重力の方向であり、他の軸は重力の方向に直交していることが好ましい。

前記力の方向は、重力の方向とは異なり、重力の大きさより大きいことが好ましい。前記力は、重力と遠心力との合力であってもよい。前記第 1 培養容器と前記第 2 培養容器は同一であることが好ましい。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の第 1 実施例による多能性幹細胞の培養方法で使用される重力分散型培養装置 1 を示し、

図 2 は、本発明の第 1 実施例による多能性幹細胞の培養方法で使用される過重遠心培養装置 1 1 を示し、

図 3 は、本発明の第 2 実施例による多能性幹細胞の培養方法で使用される培養装置を示し、

図 4 は、第 2 実施例で使用される培養装置の動作を説明するための図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、米国出願番号 1 0 / 1 1 9 , 8 9 5 , 1 0 / 2 3 3 , 5 0 6 、 及び 1 0 / 2 3 3 , 5 6 6 と関連する。それらの開示は、引用により本願発明に取り込まれる。

以下、添付図面を参照して、本発明による多能性幹細胞の培養方法について詳細に説明する。

最初に、本発明の第 1 実施例による多能性幹細胞の培養方法では、多能性幹細胞が、生体から取り出される。例えば、ラットの多能性幹細胞の場合、ラット大腿骨から骨髓細胞が取り出される。取り出された骨髓細胞は、牛胎児血清を含む培地に懸濁される。骨髓細胞が懸濁された培地は、遠心分離法により脂肪成分と細胞沈査とに分離される。得られた細胞沈査は、密度勾配遠心法によって低密度分画と高密度分画とに分離される。その低密度分画から多能性幹細胞がフローサイトメトリにより分離される。続いて、取り出された多能性幹細胞が、図 1 に示されている重

力分散型培養装置 1 により、2 軸回転されながら培養される。

重力分散型培養装置 1 は、培養容器 2、本体 3、モータ 4、外側フレーム 5、モーター 6、及び内側フレーム 7 を備えている。培養容器 2 には、多能性幹細胞と培地とが封入されている。本体 3 は、基部 3 a と脚 3 b、3 c を有している。脚 3 b、3 c は基部 3 a から上方に延び、外側フレーム 5 を回転可能に支持している。脚 3 b には、外側フレーム 5 に接続されたモータ 4 が設けられている。モータ 4 により、回転軸 4 a の回りに外側フレーム 5 は回転させられる。外側フレーム 5 は、内側フレーム 7 が回転可能に支持され、また、外側フレーム 5 は、内側フレーム 7 に接続されたモータ 6 が設けられている。モータ 6 により、回転軸 6 a の回りに内側フレーム 7 は回転させられる。回転軸 6 a は、回転軸 4 a と概ね直交する。内側フレーム 7 は、培養容器 2 を固定的に支持することができる。培養容器 2 は、内側フレーム 7 内の、回転軸 4 a と回転軸 6 a との交点の近傍に載置される。こうして、培養容器 2 は、内側フレーム 7 と一体に回転される。従って、外側フレーム 5 と内側フレーム 7 とがそれぞれ回転されると、培養容器 2 は、2 軸回転されることになる。

多能性幹細胞が 2 軸回転されながら培養されると、多能性幹細胞にかかる重力の方向は 3 次元的に分散され、多能性幹細胞は、分化が抑えられた状態で増殖する。十分に増殖された後、多能性幹細胞は、図 2 に示されている過重遠心培養装置 1 1 によって培養される。

過重遠心培養装置 1 1 は、培養容器 1 2、本体 1 3、モータ 1 4、及びロータ 1 5 を備えている。培養容器 1 2 には、重力分散型培養装置 1 により培養された多能性幹細胞と培地とが封入される。培養容器 1 2 に封入される培地は、所望の分化を誘導する各種因子を含む。例えば、骨及び軟骨への分化を誘導する場合、分化誘導剤としてデキサメタソン (dexamethasone) 及び TGF- β が、培地に混入される。本体 1 3 には、ロータ 1 5 を回転軸 1 5 a の回りに回転させるように、モータ 1 4 が設けられている。回転軸 1 5 a は、重力方向に実質的に平行である。ロータ 1 5 には、培養容器 1 2 が固定されている。

ロータ 1 5 が回転すると、培養容器 1 2 には遠心力が印加され、これにより培養容器 1 2 に封入された多能性幹細胞には重力方向と垂直な水平方向に遠心力 F_1 が印加される。遠心力 F_1 の大きさは重力よりも大きい。従って、培養容器 1 2 に封入された多能性幹細胞には、遠心力 F_1 と重力 F_2 との合力 F_3 が作用する。その合力 F_3 は、多能性幹細胞に対して一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい。このとき、回転軸 1 5 a が重力方向に実質的に平行であることにより、多能性幹細胞に対する合力 F_3 の相対方向と大きさとは、概ね一定に保たれている。これは、分化を促進する上で好ましい。また、培養容器 1 2 の細胞培養面は、合力 F_3 に対して垂直に設置することが好ましい。

相対方向が一定であり、且つ、重力よりも大きい力が印加された状態で多能性幹細胞が培養されると、多能性幹細胞の分化が促進される。多能性幹細胞は、所望の状態まで

分化され、分化誘導細胞に成長する。分化誘導細胞は、生体細胞移植に使用される。

第 1 実施例では、多能性幹細胞が 2 軸回転されながら培養され、多能性幹細胞の分化を抑制しながら多能性幹細胞を培養することができる。更に、多能性幹細胞が十分に培養された後、重力よりも大きい力が一定の方向に印加された状態で多能性幹細胞が培養され、多能性幹細胞の分化が促進される。これにより、第 1 実施例では、多能性幹細胞の増殖及び分化を適切に制御することが可能である。

なお、本実施例では、分化を抑制しながら多能性幹細胞が培養されるとき、その多能性幹細胞は 2 軸回転されている。しかしながら、多能性幹細胞が 2 軸よりも多い回転軸の回りに多軸回転された状態で多能性幹細胞が培養されてもよい。多軸回転された状態で多能性幹細胞が培養された場合でも、2 軸回転の場合と同様に、多能性幹細胞にかかる重力は 3 次元的に分散され、多能性幹細胞は分化が抑えられた状態で増殖する。

次に、本発明の第 2 実施例による多能性幹細胞の培養方法について説明する。第 2 実施例による多能性幹細胞の培養方法では、図 1 の重力分散型培養装置 1 と、図 2 の過重遠心培養装置 1 1 との代わりに、図 3 に示された培養装置 2 1 が使用される。

培養装置 2 1 は、培養容器 2 2、本体 2 3、支柱 2 4、モータ 2 5、外側フレーム 2 6、モータ 2 7、及び内側フレーム 2 8 を備えている。培養容器 2 2 には、多能性幹細胞と培地とが封入される。本体 2 3 には、モータ 2 5 が設

けられる。本体 2 3 からは、支柱 2 4 が上方に、その後水平に延びている。こうして、モータ 2 7 と支柱 2 4 は、外側フレーム 2 6 を回転可能に支持している。モータ 2 5 は、回転軸 2 5 a の回りに外側フレーム 2 6 を回転させる。回転軸 2 5 a は、重力方向と平行である。外側フレーム 2 6 は、内側フレーム 2 8 を回転可能に支持し、また外側フレーム 2 6 には、モータ 2 7 が接続されている。モータ 2 7 は、内側フレーム 2 8 を回転軸 2 7 a の回りに回転する。回転軸 2 7 a は、回転軸 2 5 a にほぼ直交している。内側フレーム 2 8 には培養容器 2 2 が、回転軸 2 7 a と回転軸 2 5 a の交点の近傍に固定的に載置されている。また、内側フレーム 2 8 は、任意の回転位置で停止され、固定されることができる。培養容器 2 2 は、内側フレーム 2 8 の内側にも固定的に載置可能である。このような構成を有する培養装置 2 1 は、重力分散型培養装置 1 と過重遠心培養装置 1 1 との両方の機能を有する。

第 2 実施例では、以下のようにして多能性幹細胞が培養される。まず、第 1 実施例と同様にして、生体から多能性幹細胞が取り出される。取り出された多能性幹細胞は、培地と共に、培養容器 2 2 に封入される。培養容器 2 2 は、図 1 と同様に、回転軸 2 7 a と回転軸 2 5 a の交点の近傍に固定的に載置される。

続いて、培養容器 2 2 を 2 軸回転しながら多能性幹細胞が培養される。即ち、モータ 2 5 が外側フレーム 2 6 を回転させ、且つ、モータ 2 7 が内側フレーム 2 8 を回転させる状態で、培養容器 2 2 の中で多能性幹細胞が培養され

る。モータ 25 が外側フレーム 26 を回転し、且つ、モータ 27 が内側フレーム 28 を回転すると、培養容器 22 は 2 軸回転する。培養容器 22 が 2 軸回転されると、多能性幹細胞にかかる重力は 3 次元的に分散され、多能性幹細胞は、分化が抑えられた状態で増殖する。

多能性幹細胞が十分に増殖された後、培養容器 22 に封入された培地が、所望の分化を誘導する各種の分化因子を含む培地に交換される。続いて、図 3 に示すように、内側フレーム 28 は、所定の位置に固定され、培養容器 22 は、内側フレーム 28 の内側にも固定的に取り付けられる。

続いて、多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい力が多能性幹細胞に印加された状態で、多能性幹細胞が培養される。より詳細には、図 4 に示されているように、外側フレーム 26 が、回転軸 25a のまわりに回転され、内側フレーム 28 は、外側フレーム 26 に対して一定の角度をなすように固定された状態で、多能性幹細胞の培養が行われる。このとき、モータ 27 は、内側フレーム 28 を回転させない。これにより、培養容器 22 は一軸回転され、培養容器 22 には、遠心力 F_1 とともに重力 F_2 が印加される。培養容器 22 に封入された多能性幹細胞には、遠心力 F_1 と重力 F_2 との合力 F_3 が作用する。その合力 F_3 は、多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい。

既述のように、重力よりも大きい力が一定の方向に印加された状態で多能性幹細胞が培養されると、多能性幹細胞

の分化が促進される。多能性幹細胞は、所望の状態まで分化され、分化誘導細胞に成長する。分化誘導細胞は、生体細胞移植に使用される。

第2実施例でも、第1実施例と同様に、多能性幹細胞の増殖及び分化が適切に制御される。更に第2実施例は、第1実施例よりも培養に必要な装置が削減されている点で好ましい。

次に、本発明の第3実施例による多能性幹細胞の培養方法について説明する。第3実施例による多能性幹細胞の培養方法では、図3に示された培養装置21が使用される。

第3実施例では、以下のようにして多能性幹細胞が培養される。まず、第1実施例と同様にして、生体から多能性幹細胞が取り出される。取り出された多能性幹細胞は、培地と共に、培養容器22に封入される。培養容器22は、図3に示されるように、内側フレーム28の内側に固定的に取り付けられる。

続いて、培養容器22を2軸回転しながら多能性幹細胞が培養される。即ち、モータ25が外側フレーム26を回転させ、且つ、モータ27が内側フレーム28を回転させる状態で、培養容器22の中で多能性幹細胞が培養される。モータ25が外側フレーム26を回転し、且つ、モータ27が内側フレーム28を回転すると、培養容器22は2軸回転する。培養容器22が2軸回転されると、第2実施例の場合と同様に、多能性幹細胞にかかる重力は3次元的に分散され、多能性幹細胞は、分化が抑えられた状態で増殖する。

多能性幹細胞が十分に増殖された後、内側フレーム 2 8 と外側フレーム 2 6 の回転が停止され、培養容器 2 2 に封入された培地が、所望の分化を誘導する各種の分化因子を含む培地に交換される。続いて、図 4 に示されているように、外側フレーム 2 6 が、回転軸 2 5 a のまわりに回転され、内側フレーム 2 8 は、外側フレーム 2 6 に対して一定の角度をなすように固定された状態で、多能性幹細胞の培養が行われる。これにより、多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい力が多能性幹細胞に印加された状態で、多能性幹細胞が培養される。

より詳細には、このとき、モータ 2 7 は、内側フレーム 2 8 を回転させない。これにより、培養容器 2 2 は一軸回転され、培養容器 2 2 には、遠心力 F_1 とともに重力 F_2 が印加される。培養容器 2 2 に封入された多能性幹細胞には、遠心力 F_1 と重力 F_2 との合力 F_3 が作用する。その合力 F_3 は、多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい。

本発明により、多能性幹細胞の増殖及び分化を適切に制御できる多能性幹細胞の培養方法及び培養装置が提供される。

請求の範囲

1. (a) 第1培養容器に封入された多能性幹細胞の分化を抑制しながら前記多能性幹細胞を培養するステップと、

(b) 第2培養容器に封入された前記培養された多能性幹細胞に力を印加して前記多能性幹細胞の分化誘導を促進しながら前記培養された多能性幹細胞を培養するステップと

を具備する多能性幹細胞の培養方法。

2. 請求項1に記載の多能性幹細胞の培養方法において、

前記(a)培養するステップは、

重力の方向を3次元的に分散して前記分化を抑制するステップ

を具備する多能性幹細胞の培養方法。

3. 請求項2に記載の多能性幹細胞の培養方法において、

前記(a)培養するステップは、

前記多能性幹細胞を n 軸回転(n は2以上の整数)させて重力の方向を3次元的に分散するステップ

を具備する多能性幹細胞の培養方法。

4. 請求項3に記載の多能性幹細胞の培養方法において、

前記 n は 2 であり、1 軸は重力の方向であり、他の軸は重力の方向に直交している
多能性幹細胞の培養方法。

5. 請求項 1 乃至 4 の何れかに記載の多能性幹細胞の培養方法において、

前記力の方向は、重力の方向とは異なる
多能性幹細胞の培養方法。

6. 請求項 5 に記載の多能性幹細胞の培養方法において、

前記力は、重力の大きさより大きい
多能性幹細胞の培養方法。

7. 請求項 6 に記載の多能性幹細胞の培養方法において、

前記力は、重力と遠心力との合力である
多能性幹細胞の培養方法。

8. 請求項 1 乃至 7 の何れかに記載の多能性幹細胞の培養方法において、

前記第 2 培養容器には分化誘導剤が培地に混入されている
多能性幹細胞の培養方法。

9. 請求項 1 乃至 8 の何れかに記載の多能性幹細胞の培

養方法において、

前記（a）培養するステップと前記（b）培養されるステップは、同一装置で行われる多能性幹細胞の培養方法。

10. 請求項1乃至9の何れかに記載の多能性幹細胞の培養方法において、

前記第1培養容器と前記第2培養容器は同一である多能性幹細胞の培養方法。

11. 多能性幹細胞を収容する培養容器が取り付けられる内側フレームと、

前記内側フレームを回転可能に支持する外側フレームと、

前記内側フレームを第1回転軸の周りに回転させる第1モータと、

前記外側フレームを回転可能に支持する支持部と、

前記外側フレームを第2回転軸の周りに回転させる第2モータと

を具備する培養装置。

12. 請求項11に記載の培養装置において、

前記第2回転軸は重力の方向である培養装置。

13. 請求項12に記載の培養装置において、

前記第1回転軸は前記第2回転軸と直交する方向である

培養装置。

14. 請求項11乃至13のいずれかに記載の培養装置において、

前記第2モータは、前記第1モータから独立に回転可能である培養装置。

15. 請求項14に記載の培養装置において、

前記内側フレームは所定の回転位置で固定可能である培養装置。

16. 請求項11乃至15の何れかに記載の培養装置において、

前記培養容器は、前記第1回転軸と前記第2回転軸との交点の近くで前記内側フレームに取り付けられる培養装置。

17. 請求項16に記載の培養装置において、

前記多能性幹細胞の分化を抑制しながら前記多能性幹細胞を培養するときは、前記培養容器は、前記第1回転軸と前記第2回転軸との交点の近くで前記内側フレームに取り付けられ、前記多能性幹細胞の分化を誘導するときは、前記培養容器は、前記内側フレームの端部に取り付けられる培養装置。

18. 請求項11乃至15の何れかに記載の培養装置に

において、

前記培養容器は、多能前記内側フレームの端部に取り付けられる培養装置。

19. 第1培養容器に封入された多能性幹細胞の分化を抑制しながら前記多能性幹細胞を培養するための第1手段と、

第2培養容器に封入された前記培養された多能性幹細胞に力を印加して前記培養された多能性幹細胞の分化誘導を促進しながら前記多能性幹細胞を培養する第2手段とを具備する多能性幹細胞の培養システム。

20. 請求項19に記載の多能性幹細胞の培養システムにおいて、

前記第1手段は、

重力の方向を3次元的に分散して前記分化を抑制する多能性幹細胞の培養システム。

21. 請求項20に記載の多能性幹細胞の培養システムにおいて、

前記第1手段は、前記多能性幹細胞を n 軸回転（ n は2以上の整数）させて重力の方向を3次元的に分散する多能性幹細胞の培養システム。

22. 請求項21に記載の多能性幹細胞の培養システムにおいて、

前記 n は 2 であり、1 軸は重力の方向であり、他の軸は重力の方向に直交している多能性幹細胞の培養システム。

23. 請求項 19 乃至 22 の何れかに記載の多能性幹細胞の培養システムにおいて、

前記力の方向は、重力の方向とは異なる多能性幹細胞の培養システム。

24. 請求項 23 に記載の多能性幹細胞の培養システムにおいて、

前記力は、重力の大きさより大きい多能性幹細胞の培養システム。

25. 請求項 24 に記載の多能性幹細胞の培養システムにおいて、

前記力は、重力と遠心力との合力である多能性幹細胞の培養システム。

26. 請求項 19 乃至 25 の何れかに記載の多能性幹細胞の培養システムにおいて、

前記第 2 培養容器には分化誘導剤が培地に混入されている多能性幹細胞の培養システム。

27. 請求項 19 乃至 26 の何れかに記載の多能性幹細胞の培養システムにおいて、

前記第 1 培養容器と前記第 2 培養容器は同一である

多能性幹細胞の培養システム。

Fig. 1

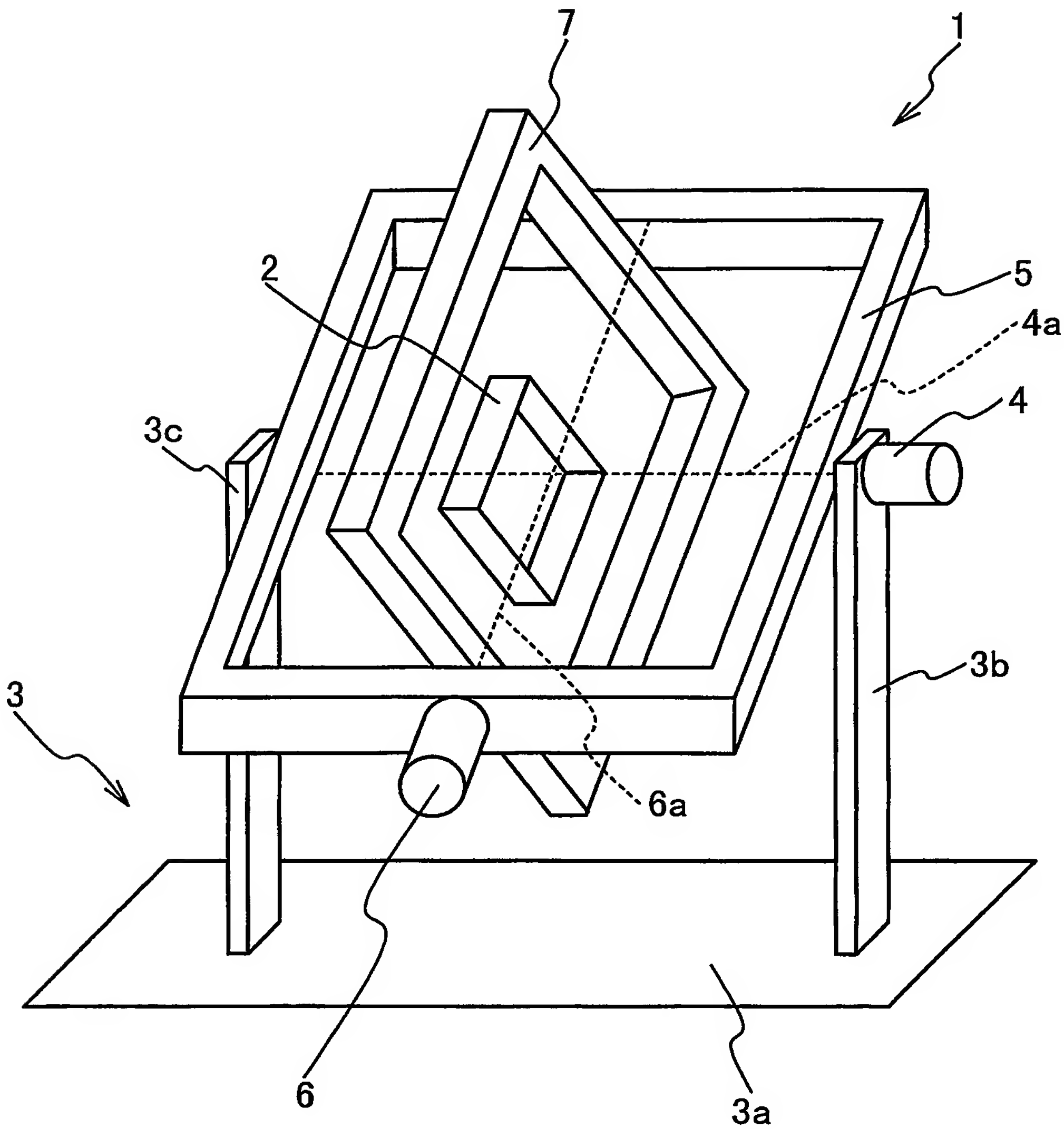


Fig. 2

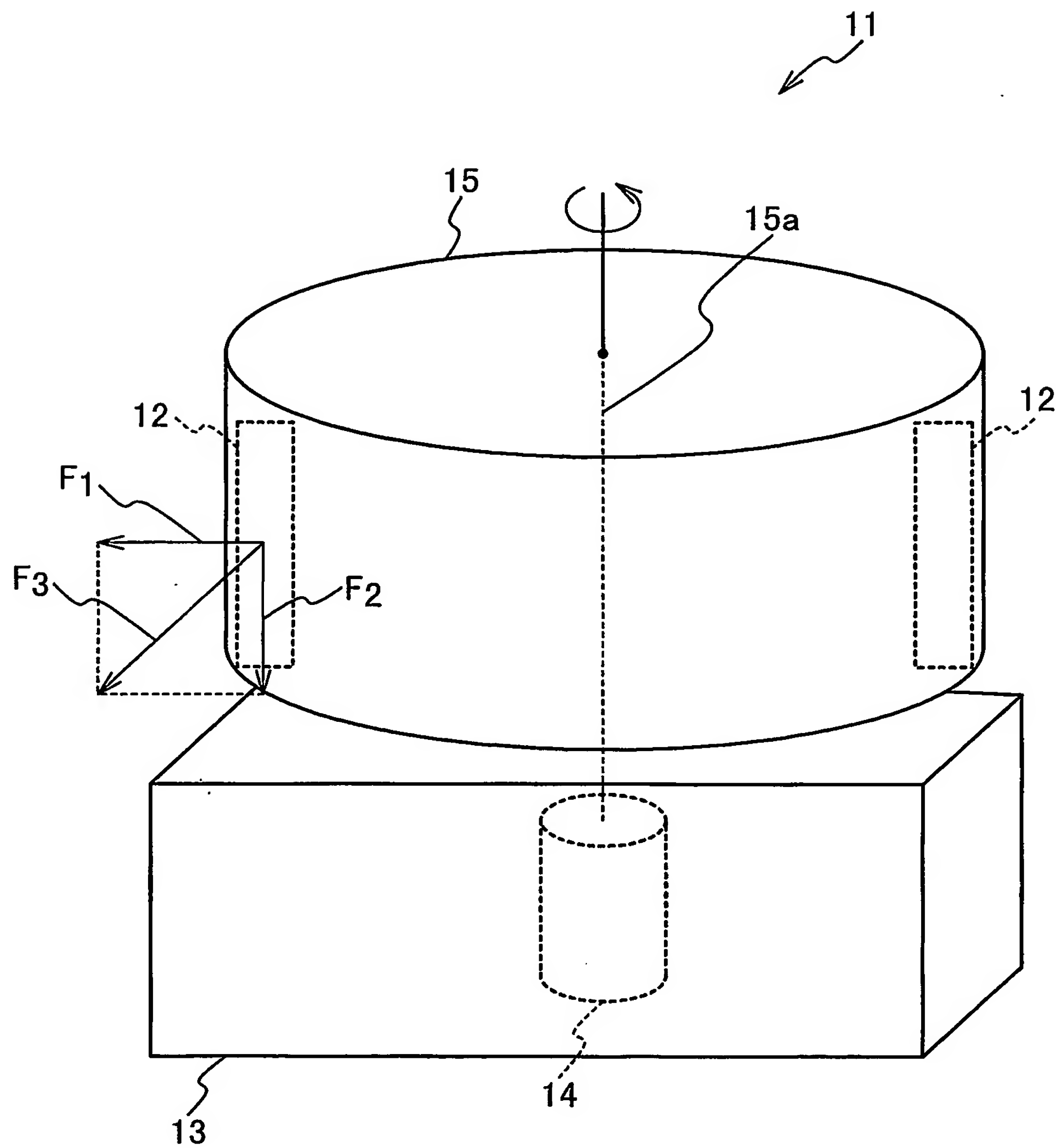


Fig. 3

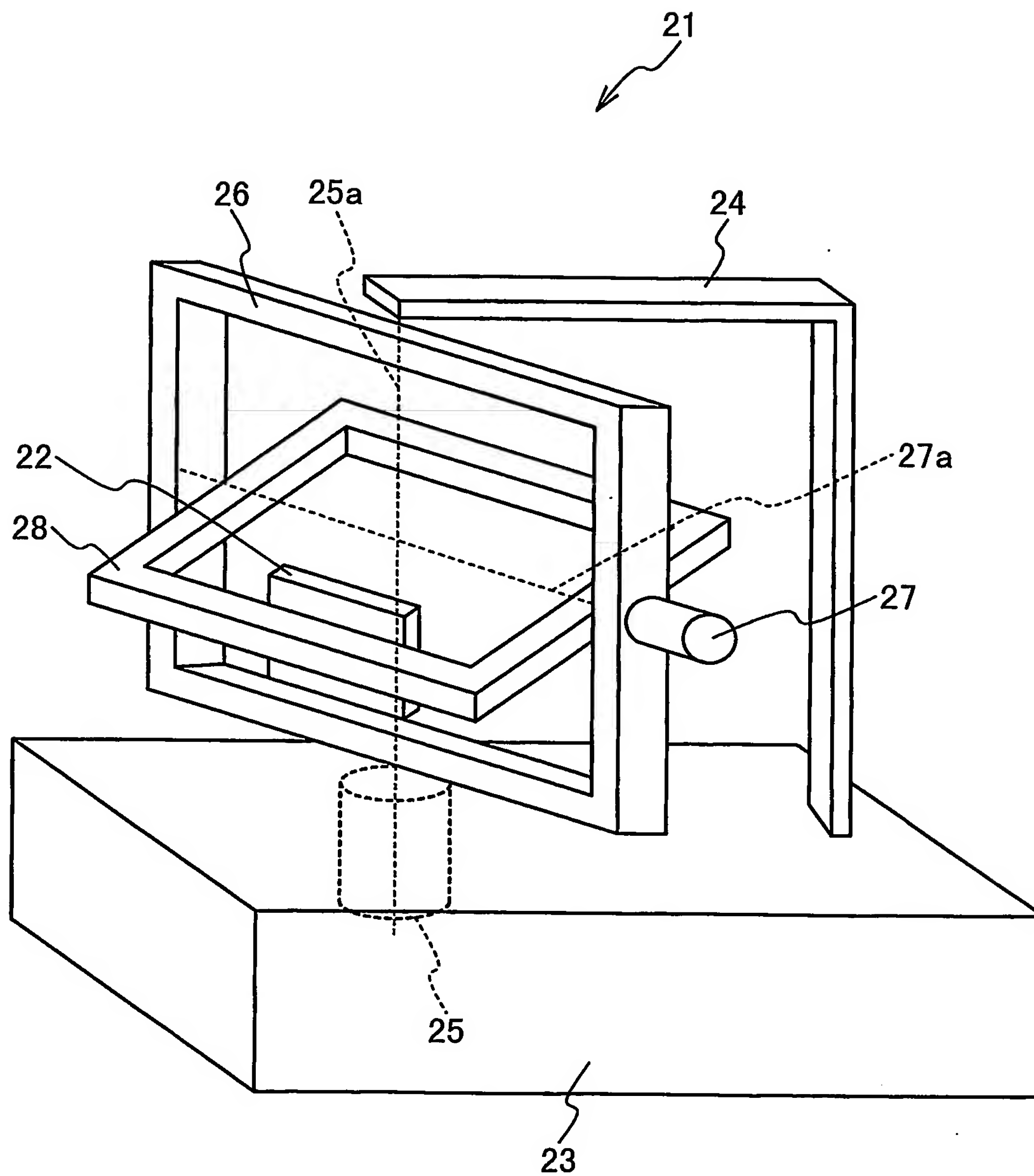
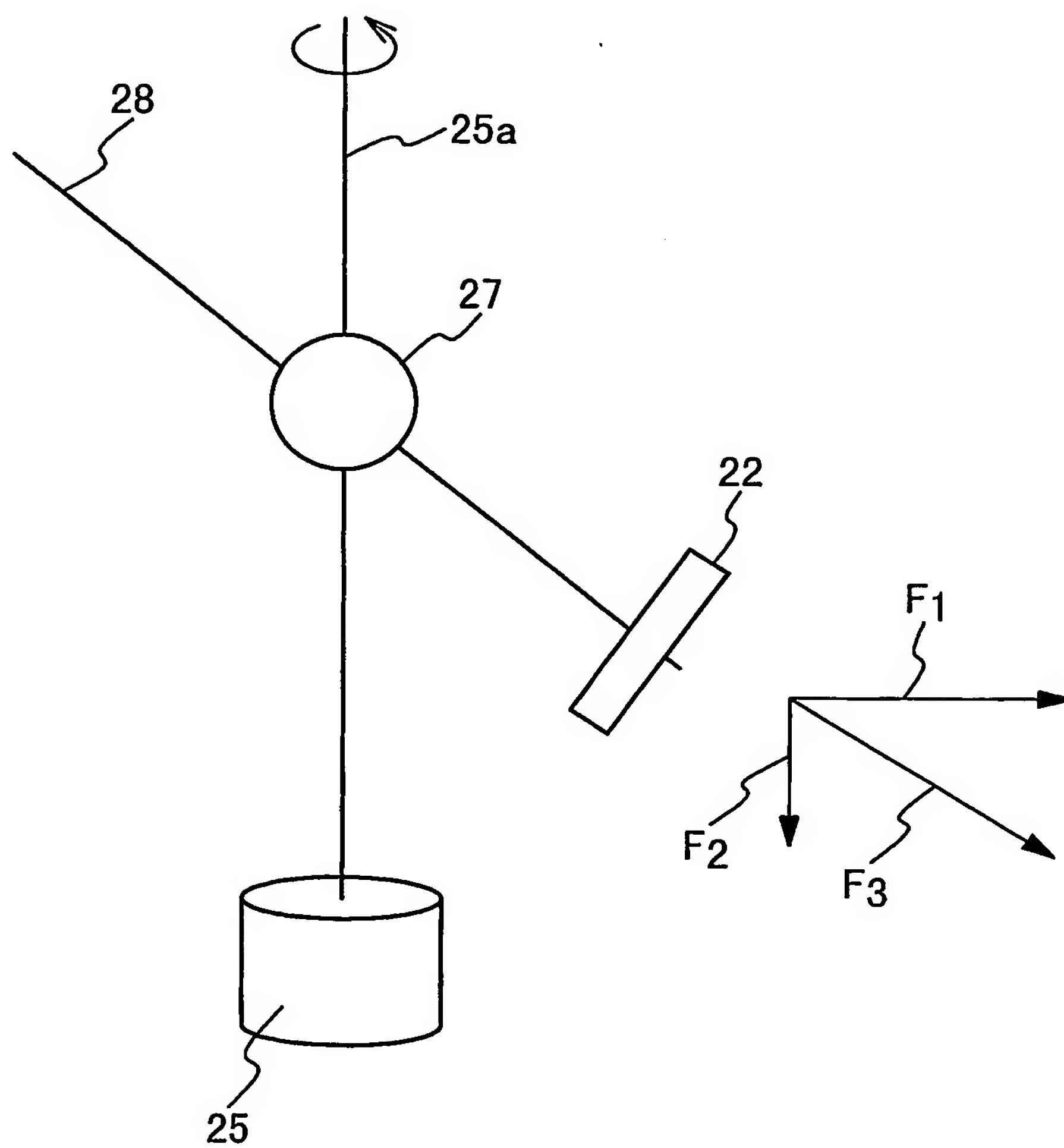


Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N5/08, C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N5/08, C12M3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 95/33821 A1 (ADVANCED TISSUE SCIENCES INC.), 14 December, 1995 (14.12.95), & EP 812351 A1 & US 5902741 A & US 5962325 A & JP 2002-502226 A	1 2-27
X	JP 2002-45173 A (Yugen Kaisha ECT), 12 February, 2002 (12.02.02), (Family: none)	11-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
03 April, 2003 (03.04.03)

Date of mailing of the international search report
13 May, 2003 (13.05.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N5/08、C12M3/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N5/08、C12M3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、JICSTファイル (JOIS)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 95/33821 A1 (ADVANCED TISSUE SCIENCES INC) 1995.12.14 & EP 812351 A1 & US 5902741 A & US 5962325 A & JP 2002-502226 A	1 2-27
X	JP 2002-45173 A (有限会社イー・シー・ティ) 2002.02.12 (ファミリーなし)	11-16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
03.04.03

国際調査報告の発送日
13.05.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
田村明照 (印)
電話番号 03-3581-1101 内線 3448